



单质粒模式诱导表达载体系统的建立*

刘定燮 周晓巍 黄培堂**

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 在 Invitrogen 公司 T-Rex 诱导表达系统的基础上, 将目的基因与调控蛋白基因克隆于同一载体上, 并在 CV1 细胞中观察了四环素对该单质粒模式载体报告基因表达的诱导效应. 载体在瞬时转染 CV1 细胞并以四环素诱导 24 h 后目的基因的表达水平提高了 8.9 倍, 表明单质粒模式载体基因诱导表达的应用具有可行性.

关键词 诱导表达, 载体, 四环素, 单质粒模式

学科分类号 Q78

基因诱导表达系统在蛋白质功能研究和细胞毒性蛋白制备中有重要意义. 目前商品化的诱导系统均是以双质粒模式建立, 即目的基因与调控蛋白基因分别位于两个不同的载体上^[1]. 因此要建立一个诱导系统需进行两次转染, 并需筛选出稳定高表达调控蛋白的细胞株, 过程繁琐、耗时较长^[1]. 尤其对于转染效率低的细胞株更不易操作. 因此, 我们以 Invitrogen 公司 T-REx 系统 (www.invitrogen.com) 为基础, 设计了单质粒模式的诱导表达载体, 将目的基因与调控蛋白基因克隆于同一表达载体上, 并在非洲绿猴肾细胞 CV1 中观察了四环素 (Tet) 对载体报告基因表达的诱导效应.

1 材料和方法

1.1 质粒与细胞株

质粒 pc6/TR 为大肠杆菌四环素阻遏蛋白 (TetR) 的真核表达载体, pcDNA4/TO 为巨细胞病毒 (CMV) 启动子下游含 2 个 TetR 结合位点 (TetO) 的表达载体, 均购自 Invitrogen 公司. pGL3-control 和 pRLTK (Promega 公司) 分别为表达 Luciferase 和 Renilla 虫荧光素酶基因的质粒. pIRESneo (ClonTech 公司) 为含内部核糖体进入位点 (IRES) 的双顺反子表达载体, CV1 细胞由军事医学科学院五所细胞库提供.

单质粒模式表达载体构建的基本策略是, 将质粒 pGL3-con 中的 Luciferase 基因插入至载体 pcDNA4/TO 的多克隆位点间 (该重组质粒命名为 pc4Luc), 再将质粒 pc6/TR 的 TetR 基因片段插入至载体 pIRESneo 的多克隆位点间, 然后将该两个重组质粒的主要框架进行拼接, 将获得的重组质粒

命名为 pc3LucpTR3, 详细构建过程可参阅文献 [2]. 实验中还构建了重组质粒 pc3LucpTR3 作为对照, 与 pc4LucpTR3 比较, 该质粒不含 TetO^[2].

1.2 细胞培养及质粒转染

CV1 细胞培养于 96 孔培养板中, 至 80% 满底时以 lipofectimine 介导质粒转染. 以 Luciferase 表达质粒 30 ng (某些情况下还包括质粒 pc6/TR 30 ng) 和质粒 pRLTK 3 ng 转染细胞, 以小牛胸腺 DNA 补充转染总 DNA 量至 100 ng. 转染 2 天后向培养液中加入 1 mg/L Tet (Sigma 公司) 诱导 24 h, 检测荧光素酶活性. 每一转染重复 3 次.

1.3 荧光素酶活性的检测

以 20 μ l 裂解缓冲液 (Promega 公司) 裂解细胞, 以双荧光检测试剂盒 (Promega 公司) 测定每一样品的 Luciferase 和 Renilla 酶活性, 操作同说明书. 以 Renilla 酶活性标化转染效率 (设置为 100), 换算出 Luciferase 酶活性. 每一转染实验重复 3 次.

2 结果和讨论

Invitrogen 公司的 T-REx 系统包括两个质粒, 一个是表达 TetR 的载体 pc6/TR, 另一个是插入目的基因的载体 pc4DNA/TO (相当于我们实验中的 pc4Luc). 对于该系统, Invitrogen 公司推荐的实验流程是, 先以 pc6/TR 转染靶细胞, 通过选择培养筛选出高表达 TetR 的细胞株; 然后以含目的基因的 pc4DNA/TO 转染该细胞株, 再筛选出目的

* 中国博士后科研基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66930012, E-mail: zhouxw@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-02-26, 接受日期: 2003-03-24

基因的表达受到四环素严谨调控的细胞株 (www.invitrogen.com). 实验需两次转染, 过程繁琐.

因此我们尝试将目的基因和调控蛋白基因克隆于同一质粒上, 构建了一个单质粒模式的诱导表达载体 (pc4LucpTR3), 图 1 为其结构示意图. 该载体中, CMV 启动子控制报告基因 Luciferase 荧光素酶的转录, 而 TetR 编码区与用作抗性筛选的 Neo

基因由 IRES 相连接, 由 SV40 早期启动子转录成双顺反子. 该诱导表达载体的工作原理是, SV40 启动子转录单位表达 TetR 蛋白, 其在与 CMV 启动子下游的 TetO 位点结合后, 将反式抑制荧光素酶基因的转录, 但在有四环素存在时, TetR 与四环素结合后即从 TetO 上解离, 荧光素酶基因的转录将得以开放.

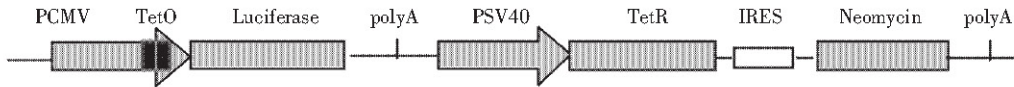


Fig. 1 Representation of recombinant plasmid construction of pc4LucpTR3

我们在 CV1 细胞中观察了四环素对载体 pc4LucpTR3 的 Luciferase 基因诱导表达情况, 实验中以不含 TetR 或 TetO 的质粒 pc4Luc 和 pc3LucpTR3 作为对照. 从表 1 可见, 在 CV1 细胞中转染质粒 pc4Luc 或 pc3LucpTR3 并经 Tet 诱导 24 h 后, Luciferase 的表达量无变化, 与预期一致, 而转染质粒 pc4LucpTR3 经诱导后 Luciferase 的表达提高了 8.9 倍.

上述结果一方面表明单质粒模式的诱导表达载体具有应用可行性, 另一方面也提示我们所构建的载体 pc4LucpTR3 有待作相应的改进, 包括进一步提高目的基因在诱导后的表达水平, 同时又降低其在诱导前的本底. 下一步我们将尝试以更强的启动子取代 pc4LucpTR3 中的 SV40 启动子, 以增强 TetR 的表达, 另外也会考虑以具转录抑制功能的结构域融合于 TetR 的 C 端, 以增强 TetR 对目的基因转录的抑制作用.

Table 1 Comparison of Tet-induced luciferase activity of different transfections

Luciferase activity	Transfected plasmid		
	pc4Luc	pc3LucpTR3	pc4LucpTR3
- Tet	1 727 ± 337	1 703 ± 334	358 ± 51
+ Tet	1 886 ± 352	1 685 ± 291	3 170 ± 659
Fold induction	1. 10	0. 99	8. 85

x ± s.

参 考 文 献

1 Rossi F M, Blau H M. Recent advances in inducible gene expression systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9 (1): 451 ~456

2 刘定燮. SV40 载体/Cos7 细胞稳定表达系统的建立与改进. [博士后出站工作报告]. 北京: 军事医学科学院生物学博士后流动站, 2002

Liu D X. Establishment and Improvement of SV40 rector/Cos7 cell system for gene seakle expression. [Thesis]. Beijing: Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, 2000

Design and Construction of Inducible Expression Vector by Single-Plasmid Strategy*

LIU Ding-Xie, ZHOU Xiao-Wei, HUANG Pei-Tang**
(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract On the basis of T-Rex inducible expression system, a vector that express reporter gene and regulated gene simultaneously were constructed. The induction effects of tetracycline to the gene expression were studied in CV1 cells by transient transfection. An 8.9-fold increase in expression level of reporter gene was observed when CV1 cells, which were transiently transfected with the vector, were induced with tetracycline for 24 h, suggesting that the application of single-plasmid vecor in gene expression induction is also feasible.

Key words expression system, vector, tetracycline, single-plasmid strategy

* This work was supported by a grant from The China Postdoctoral Science Foundation.
** Corresponding author. Tel: 86-10-66930012, E-mail: zhouxw@nic.bmi.ac.cn
Received: February 26, 2003 Accepted: March 24, 2003